

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K14233

研究課題名(和文) 未来エネルギー水素液体キャリアのアンモニア生産のための根粒菌の共生からの自立育種

研究課題名(英文) Molecular breeding of ammonia-producing bacteria

研究代表者

植田 充美 (Ueda, Mitsuyoshi)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：90183201

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：有名なハーバーボッシュ法による窒素の固定・アンモニア製造の化学手法は、エネルギー消費量の大きいため、新たな方法の開拓が必須になっている。自然界におけるマメ科植物と根粒菌の共生による窒素固定は、アンモニアの実用生産には不向きである。独自に開発してきたモノリス分析材料を用いた分離媒体による根粒菌のプロテオーム解析から、共生に依存しない、根粒菌のみによる窒素固定が可能であることがわかってきた。そこで、未来のエネルギーともいえる「水素のキャリアーとしてのアンモニア生産」系の構築に、ゲノム編集により、共生に依存しない自立した根粒菌のみによるアンモニア生産育種に成功した。

研究成果の概要(英文)：Rhizobia are soil bacteria that fix nitrogen under the symbiotic condition with host legumes. In the root nodule, rhizobia differentiate into a bacteroid, a symbiosis-specific form, and then they fix nitrogen and provide ammonia as a nitrogen source to host plant. Many proteins other than nitrogenase complex are involved in nitrogen fixation. In this study, we performed quantitative proteome analysis during nodule development to elucidate the mechanism of bacteroid differentiation. Quantitative proteome profiling showed that the proteins encoded on the symbiosis island were up-regulated under the symbiotic condition. Moreover, time course analysis indicated that nitrogenase complex was constructed after the construction of its redox centers, such as FeMo cofactor and 4Fe:4S cluster. Our quantitative proteome analysis can be helpful for clarification of mechanism of nitrogen fixation.

研究分野：応用生物科学

キーワード：プロテオーム解析 アンモニア生産育種 液体水素エネルギー

様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

共生窒素固定細菌である根粒菌 *Mesorhizobium loti* は、宿主であるマメ科植物ミヤコグサ *Lotus japonicus* との共生時には窒素固定することが知られている。しかし、なぜ非共生状態では起こらないのに、ミヤコグサに根粒菌を感染させ、共生時のみに窒素固定が可能になるのかについては遺伝子発現とプロテオーム解析の網羅的な十分な分子解析がなされてきていない。この根粒菌感染と窒素固定の要素の2つの生命現象による共生という生命現象の分子レベルで解明が現在不十分である。

この共生により生産されるアンモニアは植物の生育には重要で、人工合成されたものは肥料に使われ、人口増加に伴ってその需要が増加しつつある。また最近では、アンモニアを水素エネルギーの最適な運搬体として利用することを目的とした研究も進んでおり、さらなるアンモニアの需要が見込まれる。現在、その生産のほとんどがハーバー・ボッシュ法によるものであるが、大規模な生産施設を必要とし、非常に大量のエネルギーを消費することが問題となっている。

2. 研究の目的

有名なハーバーボッシュ法による窒素の固定・アンモニア製造の化学手法に100年間も依存してきた現代社会は、エネルギー消費量(高温高圧 - 500気圧、600-800K)の大きさに、新たな方法の開拓が必須になっている。自然界におけるマメ科植物と根粒菌の共生による窒素固定は、産業的にはアンモニアの実用生産には不向きである。ゲノム解析と独自に開発してきたモノリス分析材料を用いた分離媒体による根粒菌のプロテオーム解析から、共生に依存しない、根粒菌のみによる窒素固定が可能であることがわかってきた(BMC Microbial., 13: 180 (2013))。そこで、未来のエネルギーともいえる「水素のキャリアーとしてのアンモニア生産」系の構築に、ゲノム編集による遺伝子発現系の切り替えにより、共生に依存しない自立した根粒菌のみによるアンモニア生産育種に挑戦する。

3. 研究の方法

マメ科植物と根粒菌の共生による窒素固定は、窒素固定酵素の脆弱性ゆえに、大量生産には不向きである。我々は、ゲノム解析と独自に開発してきたモノリス分析材料を用いた分離媒体による根粒菌のプロテオーム解析から、遺伝子発現系の切り替えにより、微生物だけによるマメ科植物に依存しない窒素固定が可能であることを明らかにしつつある。この解析を通じて、微生物単独の窒素固定とアンモニア生産系の確立をめざす。これにより、未来のエネルギーとも言える「水素のキャリアーとしてのアンモニア生産」系の構築も同時にめざして、微生物工学の資源創出への展開も拡大していく。

(1) 共生窒素固定細菌である根粒菌 *Mesorhizobium loti* のプロテオーム解析

共生窒素固定細菌である根粒菌 *Mesorhizobium loti* は、宿主であるマメ科植物ミヤコグサ *Lotus japonicus* との共生時には窒素固定するが、なぜ非共生状態では起こらないのか。

ミヤコグサに根粒菌を感染させ、共生時のみに窒素固定が可能になるのかについては遺伝子発現とプロテオーム解析の網羅的な十分な分子解析がなされてきていない。

そこで、培養した *L. japonicus* に *M. loti* を接触させ、根粒を形成させ、比較対照として通常培地で培養した *M. loti* を非共生状態サンプルとして培養したのち、根粒内及び、非共生状態の微生物を破碎し、タンパク質試料を調製する。次に、独自に開発したキャピラリーモノリスカラムを用いたLC/MS/MSシステムによる高分解能と高速性能をもつプロテオーム解析系を構築し、網羅的なタンパク質の解析を行う。

判明した共生状態と非共生状態で発現するタンパク質をすべて網羅的に同定するタンパク質のプロファイルにより、感染と窒素固定の要素の含有による共生という生命現象を遺伝子レベルならびに、発現、すなわち、プロテオームレベルで明らかにする。

(2) 微生物単独での窒素固定とアンモニア生産への挑戦

上記、データをもとに、根粒菌での宿主ベクター系の構築により、根粒菌のみで、あるいは、他の酵母などの微生物に遺伝子を移し替え、空中窒素の固定と水素キャリアーとしてのアンモニア生産という植物との共生に依存しない「微生物単独」での大量実用生産系の構築をめざす。

4. 研究成果

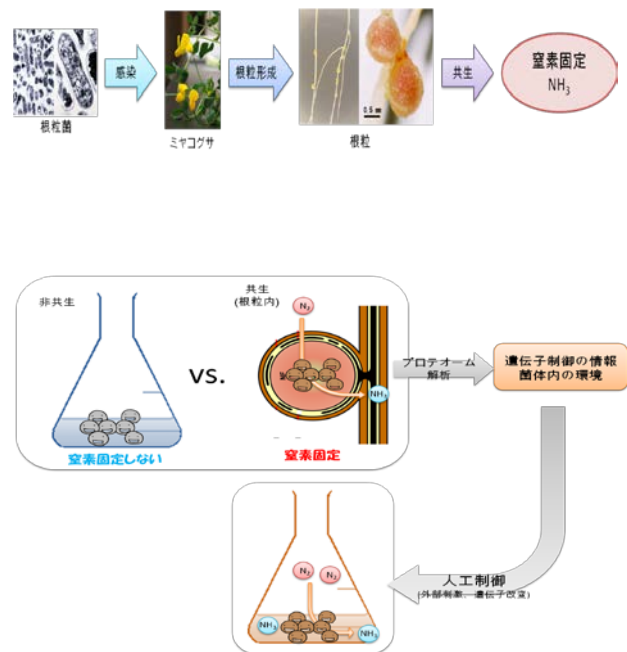
根粒菌は、マメ科の植物との共生状態下における窒素固定状態と、土壌中で生活する非窒素固定状態の二つの状態を持つ。この差をタンパク質レベルで比較することで、窒素固定に必要な酵素、因子、タンパク質を抜き出すことを試みた。非共生状態を再現するため、根粒菌を試験管内の液体培地で培養し、窒素固定状態を再現するために宿主であるミヤコグサに根粒菌を接種し、感染状態の結果としての根粒を得た。その後、それぞれの状態からタンパク質抽出を行い、ナノフロー高速液体クロマトグラフィーと質量分析計を組み合わせた分析システムにより網羅的なタンパク質同定を行った(ショットガンプロテオミクス)。その結果、1658種類のタンパク質の同定に成功した。また、これまでの研究から、共生状態において根粒菌は共生アイランドと呼ばれる染色体の特定の遺伝子領域を活性化させることが知られていたが、本研究でも共生状態で同定したタンパク質のうち74種類がこの遺伝子領域に含まれていた。内訳として窒素固定に直接関わるもの、それ以外の機能を持つものが(機能未知)あった。この情報を基に窒素固定酵素とその他の間接的に窒素固定に関わるタンパク質を含む菌体内状態を非共生状態で再現することで、根粒菌の非共生状態での窒素固定による有用な窒素固定系の創製が可能である。

根粒菌による窒素固定は、(1)植物に大量の窒素をアンモニアの形で供給しているため、菌体外にアンモニアの形で排出することが可能である、(2)自然界で最も多くの窒素を固定している共生関係であり、窒素固定活性も高い、(3)常温常圧でのアンモニア変換が可能、(4)生体反応なので錯体と比べ、系自体が

安定である、(5)化石燃料以外のエネルギーを利用できる、(6)二酸化炭素を排出しない、などといった利点を持っている。この共生状態の特徴を非共生状態で再現することで、有用な窒素固定系を作製する。

本発明により創製される根粒菌は、生物のエネルギー源であるATPと電子を生産し、それらをもって窒素固定を行うことができるので、エネルギー取得とアンモニア生産を一括して行うことができる。これにより、アンモニア生産設備の小規模化が見込まれる。また、単純に窒素固定酵素を発現させるだけでなく、根粒菌の菌体内を窒素固定に最適な環境に変化させることで、実用に耐えうる効率のアンモニア生産系を達成できることが判明した。

根粒菌を固相に固定し、最適な栄養源と環境を与えながらフロー系での培養を行いながら窒素固定させることで、新たなアンモニア生産・回収システムの実現、及びアンモニア生産系の小規模化が期待できる。



以上まとめると、下記のようになる。

共生窒素固定細菌である根粒菌 *Mesorhizobium loti* は、宿主であるマメ科植物ミヤコグサ *Lotus japonicus* との共生時には窒素固定することが知られている。しかし、なぜ非共生状態では起こらないのに、ミヤコグサに根粒菌を感染させ、共生時のみに窒素固定が可能になるのかについては、明快な分子レベルでの検討がなされていなかった。ゲノム解析やプロテオーム解析などに代表されるオミックス研究が可能になってきたので、これらの網羅的分子解析手法により、共生現象の中に含まれる、感染と窒素固定の要素を細胞内外の分子を網羅的に解析して、微生物だけによる、マメ科植物との共生に依存しない自立した窒素固定とアンモニア生産の可能性が明らかになった。これは、未来のエネルギーともいえる「水素のキャリアとしての液体アンモニア生産」へもつながるものと考えている。しかも、微生物だけによる生産が可能であれば、培養原料を農林水産廃棄物やバイオマスを用いることが可能になり、重要栄養源であるC源、N源、H源のコストを格段に下げることができ、しかも地球温暖化防止にも貢献できるので、未来のリサイクル社会構築に大いに貢献できる。

窒素を固定してアンモニアを製造するハーバーボッシュ法は、近代社会を100年間も支えてきた有名な方法であるが、地球上の全エネルギー消費の数%を必要とするそのエネルギー消費量（高温高压 -

500気圧、600-800K）の大きさから、また、現在の地球の温暖化防止と環境負荷の軽減の観点から、新たな方法の開拓が必須になっている。未来のエネルギーとして、最近重要になってきているが、爆発性がある危険な水素のキャリアとしての安全で輸送易動な液体アンモニア生産へもつながるものと考えている。しかも、微生物だけによる生産は、産業廃棄物やバイオマスを培養原料として用いることを可能にするとともに、提唱している「**リサイクルバイオテクノロジー**」の一つとして、未来のリサイクル環境負荷軽減社会の構築に大いに寄与していくものと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

①植田充美

「未来エネルギー水素液体キャリアの農林水産廃棄物からの大量生産をめざして」
バイオマス利用研究、印刷中

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植田 充美 (UEDA, Mitsuyoshi)
京都大学大学院農学研究科・教授
研究者番号：90183201